

webeextrakt den Einfluß möglicher Störfaktoren quantitativ zu ermitteln. Außerdem ist in manchen Fällen ein chemischer oder Farb-Quench möglich, der zu einer verminderten Impulsausbeute führt und dessen Ausmaß durch Aufstellung einer Quench-Kurve berechnet werden kann, wie dies bei der Messung von radioaktiven Substanzen mit dem Flüssigkeits-Szintillationszähler üblich ist.

Diskussion

Die beschriebene Extraktions- und Bestimmungsmethode von ATP in biologischem Material zeichnet sich vor allem durch eine hohe Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit aus. Die ATP-Extrakte können ohne Verlust durch Hydrolyse lange bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Bei gleichbleibender Empfindlichkeit lassen sich mit der Lumineszenzmethode weite Konzentrationsbereiche von ATP erfassen. Während bei Untersuchungen über Veränderungen des ATP-

Gehaltes im Gewebe mitextrahierte ADP-Mengen die quantitativen Vergleiche kaum beeinflussen, muß für die Absolut-Bestimmungen von ATP das vorhandene ADP mit einer anderen Methode bestimmt und entsprechend subtrahiert werden. Diese ADP-Bestimmung kann z. B. mit dem Biochemica Test Boehringer durchgeführt werden. Durch die Verwendung eines Flüssigkeits-Szintillationszählers anstelle der bisher üblichen Photometer zur Messung der Lumineszenz können der Verbrauch von Glühwürmchenschwänzen auf ein Minimum reduziert und damit die Kosten der ATP-Bestimmung wesentlich verringert werden. Inzwischen wurden von uns mit Hilfe der beschriebenen Methode ATP-Messungen im Blut, Gehirn, Mastzellen und Knorpel mit Erfolg durchgeführt, was die Zuverlässigkeit des Verfahrens bei verschiedenstem biologischem Material bestätigt.

Literatur

1. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1962). — 2. HURLBERT, R. B., H. SCHMITZ, A. E. BRUMM und V. R. POTTER, J. biol. Chemistry 209, 23 (1954). — 3. COHN, W. E. und C. E. CARTER, J. Amer. chem. Soc. 72, 4273 (1950). — 4. KALBHEN, D. A., Arch. internat. pharmacodyn. thérap. 143, 362 (1963). — 5. WITTHAUS, G., Med. Pharmacol. exp. 15, 432 (1966). — 6. BERGER, L., M. W. SLEIN, S. P. COLOWICK und C. E. CORI in: J. Gen. Physiol. 29, 379 (1946). — 7. STREHLER, B. L. und J. R. TOTTER, Arch. Biochem. 40, 28 (1952). — 8. DUBOIS, R., zit. bei A. M. CHASE, Methods biochem. Analysis, 8, 61 (1960). — 9. McELROY, W. D., Proc. Natl.

Acad. Sci. U. S. 33, 342 (1947), zit. bei A. M. CHASE, Methods biochem. Analysis, 8, 61 (1960). — 10. McELROY, W. D. und B. L. STREHLER, Arch. Biochem. 22, 420 (1949). — 11. GREEN, A. A. und W. D. McELROY, Crystalline Firefly Luciferase. Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 20, 170 (1956). — 12. BITTER, B. und W. D. McELROY, Arch. Biochem. Biophysics 72, 358 (1957). — 13. STREHLER, B. L. und W. D. McELROY, Assay of adenosine triphosphate. In: Methods in Enzymology, Bd. III, S. 871, Academic Press — New York (1957). — 14. TAL, E., S. DIKSTEIN und F. G. SULMAN, Experientia, Basel 20, 652 (1964). —

Dr. A. D. Kalbhen
53 Bonn, Reuterstr. 2b

Eine Methode der automatischen Bestimmung des Gesamt-Eisen in Blutserum und Urin mit 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin und seiner Sulfosäure

Von R. SCHMIDT, W. WEIS, V. KLINGMÜLLER und HJ. STAUDINGER¹⁾

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität, Gießen (Direktor: Prof. Dr. HJ. Staudinger) und dem Klinisch-Chemischen Institut, Mannheim (Direktor: Prof. Dr. V. Klingmüller)

(Eingegangen am 20. März 1967)

Es wird eine direkte Bestimmung des Serumeisens im Autoanalysator mit der Sulfosäure des neusynthetisierten 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin in allen Einzelheiten beschrieben. Dieser Komplexbildner besitzt einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 26900$. Die Methode entspricht den Bedürfnissen der klinischen Diagnostik und erlaubt es, in 60 Min. 60 Bestimmungen durchzuführen. Serumproteine, Serumfarbstoffe usw. stören nicht. Das Reagenz bleibt über Monate konstant. Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Spezifität und Empfindlichkeit werden kritisch untersucht.

Full practical details are given for a direct determination of iron in serum by an autoanalyzer technique, which employs the sulfonic acid derivate of the newly synthesized 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridine. The new complexing agent possesses a high molar extinction coefficient of $\epsilon = 26,900$. The complete procedure corresponds to the needs of clinical diagnosis and requires 60 min. for 60 determinations. Serum proteins, dye-stuffs etc. do not interfere. The reagent is stable for months. Accuracy, reproducibility, specificity and sensitivity were examined critically.

Die Forderungen der modernen klinisch-chemischen Differential-Diagnostik nach einer zuverlässigen Eisenbestimmung (1, 2) führten dazu, daß bereits eine Reihe von Modifikationen im Autoanalyzer („Technicon“)

vorgeschlagen wurden: DELCOUR 1964 (3); FÜHR 1964 u. 1964 (4); HENRIKSEN 1965 (5); LANDERS 1958 (6); LEPLA und Mitarbeiter 1963 (7); SUMMERS und Mitarbeiter 1964 (8); STEINER 1965 (9); ZAK und Mitarbeiter 1964 (10). Als KRÖHNKE, STAUDINGER und Mitarbeiter (11) das neue Tripyridyl-Derivat 2,6-Di-

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem 6. Internat. Kongr. Klin. Chem., München, 26.—30. Juli 1966.

[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin („DPMPP“) in die Milliliter-Analyse einführen, und STAMM und Mitarbeiter (12) seine Brauchbarkeit in der Mikroliter-Analyse bewiesen, war es naheliegend, diese Substanz den Laboratorien mit einem Autoanalyzer bereitzustellen. Dem kam entgegen, daß LAUBER (13) eine bequeme Vorschrift der Sulfonierung des Bathophenanthrolin angegeben hat, die sich auch gut für das Tripyridyl eignet, so daß sich für die hier ausgearbeitete Vorschrift u. a. folgende Vorteile ergeben: Der molare Extinktionskoeffizient für zweiwertiges Eisen ist einer der höchsten für die bisher verwendeten Substanzen, so daß der Eisen-Nachweis damit sehr empfindlich geworden ist. Vergleichbare Komplexbildner haben für zweiwertiges Eisen folgende Extinktionskoeffizienten ($\text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$):

DPMPP	$\epsilon_{568,5} = 26900$ (11)
DPMPP-Sulfosäure	$\epsilon_{568,5} = 26900$
Bathophenanthrolin	$\epsilon_{535} = 22400$
Bathophenanthrolin-Sulfosäure	$\epsilon_{535} = 21400^{1)}$

Die Extinktion der Tripyridyle ist im praktisch vorkommenden Bereich pH-unabhängig, d. h. das pH braucht für die Photometrie nicht besonders eingestellt zu werden. Das sulfonierte Tripyridyl ist wasserlöslich, so daß bei Serumanalysen nicht enteiweißt werden muß, die Zahl der benötigten Reagenzien und Gefäße ist reduziert, wodurch bei dem ubiquitären Vorkommen von Eisen-Spuren die Fehler herabgesetzt werden.

Methodik

Reagenzien

Zum Ansetzen der Reagenzien ist glas- oder quarzbdestilliertes Wasser zu verwenden. Die verwendeten Geräte sind in üblicher Weise sorgfältig von Eisen und anderen Verunreinigungen zu befreien. Die Plastikbecher des Autoanalyzers sind eisenfrei. Zu jeder Lösung sind 1—2 Tropfen Tween 60 zuzusetzen. Das Blut ist mit eisenfreien Chrom-Vanadium-Nadeln und saubersten Spritzen zu entnehmen und in eisenfreien Plastikbehältern (Zentrifugengläser) aufzubewahren, die zum Zentrifugieren mit Stopfen verschlossen sein müssen.

0,2N HCl: 48 ml 30proz. Salzsäure (30proz, Suprapur, Fa. Merck) auffüllen auf 1 l.

0,9proz. NaCl-Lösung: Suprapur, Fa. Merck.

1proz. Hydrochinon-Lösung: In 0,9proz. NaCl-Lösung (Suprapur) frisch ansetzen und durch Glaswolle o. ä. klar filtrieren; etwa 1 Woche bei etwa 0° haltbar, braune Flasche.

0,5 mMol/l Tripyridyl-Lösung: 170 mg 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin, nach DEGGAU und Mitarbeiter (11) dargestellt, in einem 1 l Meßkolben mit etwa 1,5 ml Chlorsulfonsäure versetzen, einige Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen mit etwa 200 ml Wasser verdünnen, mit 0,2N NaOH auf ein pH von 8—14 einstellen, auf 1 l auffüllen und filtrieren; die Lösung ist monatelang haltbar.

Eisenlösungen

Stammlösung: Iron-Standard-Ferric (1 ml = 0,1 mg Fe) der Fa. Hartmann Leddin Company, Philadelphia USA.

Daraus werden nach folgendem Schema die einzelnen Eichlösungen durch Verdünnung auf 500,0 ml im Meßkolben hergestellt:

$$\begin{aligned} 20 \mu\text{g}/100 \text{ ml} &= 1,0 \text{ ml} \\ 50 \mu\text{g}/100 \text{ ml} &= 2,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

1) Wir danken Herrn Dr. H. LANG für die freundliche Mitteilung seiner Meßergebnisse.

$$\begin{aligned} 100 \mu\text{g}/100 \text{ ml} &= 5,0 \text{ ml} \\ 200 \mu\text{g}/100 \text{ ml} &= 10,0 \text{ ml} \\ 300 \mu\text{g}/100 \text{ ml} &= 15,0 \text{ ml} \end{aligned}$$

Kontrollserien

„Lab-Trol“, „Patho-Trol“ und „Moni-Trol“ (alle Fa. Merz u. Dade A. G., Bern).

„Hämosol“ (Fa. Merz u. Dade A. G., Bern) etwa 2proz. wäßr. Lösung zur Reinigung der Apparatur.

Das Absorptionsmaximum des Eisenkomplexes gegen eine eisenfreie Tripyridylsulfosäure-Lösung gemessen beträgt 568,5 nm, wie bei DEGGAU und Mitarbeiter (11).

Ausführung

Die automatische Bestimmung des Serum-Eisens im Autoanalyzer baut sich aus folgenden Teilprozessen auf (7):

1. Abspaltung des gebundenen Eisens mit Salzsäure;
2. Dialyse gegen ein Reduktionsmittel;
3. Bildung des Eisen(II)-Komplexes mit 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin-Sulfosäure.
4. Photometrie des Eisen(II)-Komplexes.

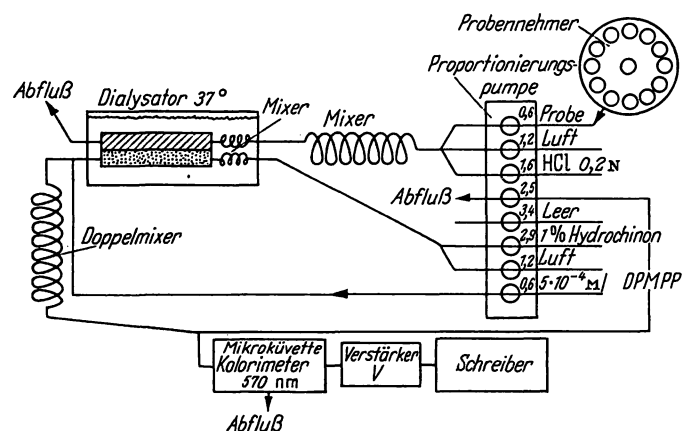


Abb. 1

Serum-Eisen-Bestimmung im Autoanalyzer; Fluß-Schema. Schlauchweiten in der Proportionierungspumpe in ml/Min., entspr. Technicon-Einheiten

Aufbau und Betriebsweise der Autoanalyzer-Elemente ergeben sich aus Abbildung 1. Für das Schlauchsystem wurden normale Tygon-Schläuche verwendet. Wegen der für den interessierenden Konzentrationsbereich von 20—300 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Eisen sehr geringen Extinktion wird dem Schreiber der Skalenspreizer „Range-Expander“ vorgeschaltet. Da das Reagenz viel empfindlicher reagiert als Vergleichssubstanzen (z. B. 1,10-Phenanthrolin), kommt man mit Verstärkerstufe 4 aus. Zum Bestimmen von geringen Eisengehalten (0—50 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) kann man dann Stufe 10 benutzen. Zunächst wird das System 15 Min. mit 0,2N HCl gespült. Der Wasserwert des Gerätes muß bei Range-Expansion 10 eine gerade Basislinie ergeben. Dann werden die Reagenzien in der Reihenfolge 0,2N HCl, Hydrochinon-Lösung, DPMPP-Sulfosäure-Lösung nacheinander zugeführt, indem man die Entnahmeschläuche aus der 0,2N HCl in die entsprechenden Gefäße hinüberwechselt. Man beobachtet eine Abnahme der Durchlässigkeit, stellt den Range-Expander auf „Fixed“ und gleicht ab. Man erhält eine Basislinie, die nur ganz geringe Schwankungen enthalten darf (10 Min. laufen lassen). Nun wird der Probeschlauch mit dem Probennehmer verbunden. Zur Trennung von Eichkurve und Serumproben untereinander wird doppelt destilliertes Wasser verwendet. Die Serumproben (1,2 ml/Min.) treten mit einer Probengeschwindigkeit von 20,40 oder 60 pro Std. in einen durch Luft segmentierten Strom von 0,2N HCl über einen „Kaktus“ ein. Nach dem Passieren einer Mischschlange wird gegen einen wieder mit Luft segmentierten Strom einer wäßr. Lösung von 1proz. Hydrochinon in 0,9proz. NaCl-Lösung bei 37—38° dialysiert. Diesem Strom wird sodann über ein kapilläres H-Stück ein kleines Volumen einer wäßr. Lösung von

2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin-Sulfosäure vom $\text{pH} \approx 10$ beigemischt. Nach der Passage durch einen Doppelmixer, zur besseren Farbausbildung durch Verlängerung des Weges, wird in der Mikroküvette mit Filter 570 nm photometriert, wozu durch Absaugen des Überschusses entlüftet wird. Nach Beendigung der Analysen wird das System gespült: 10 Min. mit Hämosol-Lösung, danach 15 Min. mit dest. Wasser.

Beschreibung und Auswertung der Versuche

Mit dem neuen sulfonierten Tripyridyl-Reagenz wurden die erforderlichen Vorversuche durchgeführt und zwei Versuchsreihen wiedergegeben (Abb. 2 u. 3 und Tab. 1 u. 3).

Der erste Versuch (Tab. 1) setzt sich aus mehreren Eichkurven zusammen, zwischen die jeweils Einzelversuche geschaltet wurden. Versuch Nr. 1—3 sind Eichkurven, welche sich wie die folgenden, aus den 4 Werten 20, 50, 100 und 200 $\mu\text{g Fe}^{++}/100 \text{ ml}$ zusammensetzen. Versuch Nr. 4 besteht aus 15 Eichlösungs-Werten zu 50 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ aus der Eichkurve, welche zu der Berechnung des Fehlers der Einzelbestimmung und des Fehlers des Mittelwertes (14) herangezogen wurden; dieser Mittelwert betrug $\bar{x} = 48,90 \mu\text{g}/100 \text{ ml} = 97,8\%$.

Versuch Nr. 5, 8, 10 und 20 sollen das Verhalten von Serum zeigen. Bei Versuch Nr. 5, der aus 10 Bestimmungen besteht, wurde ein Serengemisch II vom 25. 4. zu 112,5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml Fe}^{++}$ bestimmt; Nr. 10 stellt den gleichen Versuch als Wiederholung dar. Nr. 8 und Nr. 20 entsprechen Nr. 5 und Nr. 10, es handelt sich aber um Serengemisch I vom 4. 4. Die laufenden Versuche Nr. 6, 9, 12, 13, 15, 18, 21, 25 und 28 sind die erwähnten Eichkurven; sie werden in Tabelle 2 ausgewertet. Versuch Nr. 7 entspricht Nr. 4, die Versuche Nr. 11, 14, 16, 17, 19 und 22 sind Verdünnungen der Serengemische I oder II. Die Ergebnisse waren 86,7% bei $\bar{x} = 15,37 \mu\text{g}/100 \text{ ml Fe}^{++}$ und 107,2% bei $\bar{x} = 46,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml Fe}^{++}$, also bei Konzentrationen, die außerhalb des klinisch interessierenden Normalbereiches lagen. Im Normalbereich selbst betrug die Wiederfindung 100,9%. Die Versuche Nr. 23, 24, 26, 27, 29, 30 sind Additionsversuche unterschiedlicher Konzentration. Sie brachten im Normalbereich mit 98,3%, 97,9% und 105,1% gute Ergebnisse. Die Eichkurven (Tab. 2) sind zur Prüfung der Richtigkeit und daraus Versuch Nr. 6 zur Berechnung der Reproduzierbarkeit herangezogen worden; sie geben die Mittelwerte (\bar{x}), die Standardabweichung (s) und den Normalbereich (2 s) wieder (4).

Abbildung 3 und Tabelle 3 beschreiben weitere Versuche. Die Serengemische I und II vom 25. 4. wurden zu Additionsversuchen (Nr. 5 und Nr. 10) verwendet. Versuch Nr. 1 besteht aus 10 Werten zu 50 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ mit einer Wiederfindung von 102,6%. Die Eichkurven Nr. 2, 4, 6, 8, 11 und 13 werden in Tabelle 4 ausgewertet. Bei den Versuchen Nr. 3, 7 und 9 mit den Testseren wurde gefunden: Moni-Trol zu 98,9%, Control zu 100,7% und Patho-Trol zu 104,3%. Bei Versuch 1—13 schwankten die Ergebnisse zwischen 98,14% und 104,3%. Tabelle 4 ist die Zusammenfassung aller in Tabelle 3 enthaltenen Eichkurven und wurde wie Tabelle 2 behandelt.

Zum Vergleich und zur Beurteilung des neuen sulfonierten Reagenzes (14) wurden auch Versuche mit 1,10-Phenanthrolin (modifiziert nach LEPLA) und mit Batho-phenanthrolindisulfonsäure (15) unternommen: DPMPP-Sulfosäure ist in größerer Verdünnung anwendbar als beide Reagenzien. Man kommt also mit weniger Substanz aus. DPMPP-Sulfosäure ist in einem größeren Bereich pH-unabhängig als beide anderen Reagenzien. DPMPP-Sulfosäure wäre, wenn sie auf den Markt käme, aufgrund der einfacheren Herstellung wahrscheinlich billiger als andere Reagenzien.

Empfindlichkeit (16): Das Reagenz ergibt mit Fe^{++} eine intensivere Färbung als die gebräuchlichen anderen Komplexbildner.

Richtigkeit (14): Durch Mischversuche, Zwischenschaltung von „Control“-Serum und Eichkurven wurde die Richtigkeit geprüft. Es ergaben sich nur geringe Abweichungen von gegebenen oder berechneten Werten. **Spezifität**: In der DPMPP-Sulfosäure-Lösung liegt ein für Fe^{++} sehr spezifischer Komplexbildner vor, der mit Begleitstoffen keine störende Farbreaktionen eingeht.

Stabilität: Das Reagenz DPMPP-Sulfosäure ist über Monate beständig.

Zeitaufwand: Die Methode erlaubt es, maximal 60 Bestimmungen pro Std. durchzuführen. Da die Proben sowie die Reagenzien genau dosiert werden (automatisch), sind Verbrauch und Kosten minimal.

Eisenbestimmung im Urin

Bei unkomplizierten Fällen kann der quantitativ gesammelte Urin direkt in die Probenbecher des Autoanalysators zur Bestimmung der Eisenausscheidung gegeben werden.

Stammt der Urin von einem mit Desferrioxamin (Desferal) behandelten Patienten, muß das Eisen durch Reduktion mit Dithionit aus dem Fe(III) -Chelat freigesetzt werden. Dazu werden (17) 5,0 ml des quantitativ gesammelten Urins in einem 50,0 ml Meßkölbchen mit etwa 30 ml bidest. eisenfreien Wasser verdünnt, mit verd. Natronlauge bzw. Salzsäure auf pH 6—7 eingestellt und mit einer Spatelspitze, d. h. 30—40 mg pulverisiertem Dithionit versetzt. Durch vorsichtiges Schütteln wird gelöst und auf 50,0 ml aufgefüllt. Diese Probe ist genau so wie ein normaler Urin zu behandeln. In Recovery-Versuchen ergab sich, daß das Eisen unter diesen Bedingungen quantitativ nachgewiesen werden kann.

Beispiele

Probe 1: Desferal-Urin, durch Eigeninjektion (R. S.) von 6,6 mg Desferal/kg gewonnen. 20,0 ml der Frakt. I mit Dithionit versetzt und nach pH-Einstellung mit bidest. Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt.
Probe 2: Desferal-Urin Frakt. I: davon 20,0 ml und 10,0 ml Fe^{++} -Eichlösung (300 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) und Dithionit usw.

Probe 1: (40; 38; 38; 38) $\bar{x} = 38,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Probe 2: (98; 98; 98; 98) $\bar{x} = 98,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Berechnung: $38,5 \times 2,5 = 96,25 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ gefunden; $(96,25 \times 20 + 10 \times 300) : 50 = 98,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ berechnet. Das zugesetzte Eisen wurde somit zu 99,3% wiedergefunden.

Probe 3: Desferal-Urin Frakt. II: davon 20,0 ml mit Dithionit versetzt, pH eingestellt und mit bidest. Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt.

Probe 4: Desferal-Urin Frakt. II: davon 20,0 ml mit 10,0 ml Fe^{++} -Eichlösung (300 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) und Dithionit versetzt usw.

Probe 3: (50; 46; 46; 46) $\bar{x} = 47,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Probe 4: (116; 116; 116; 116) $\bar{x} = 116,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$

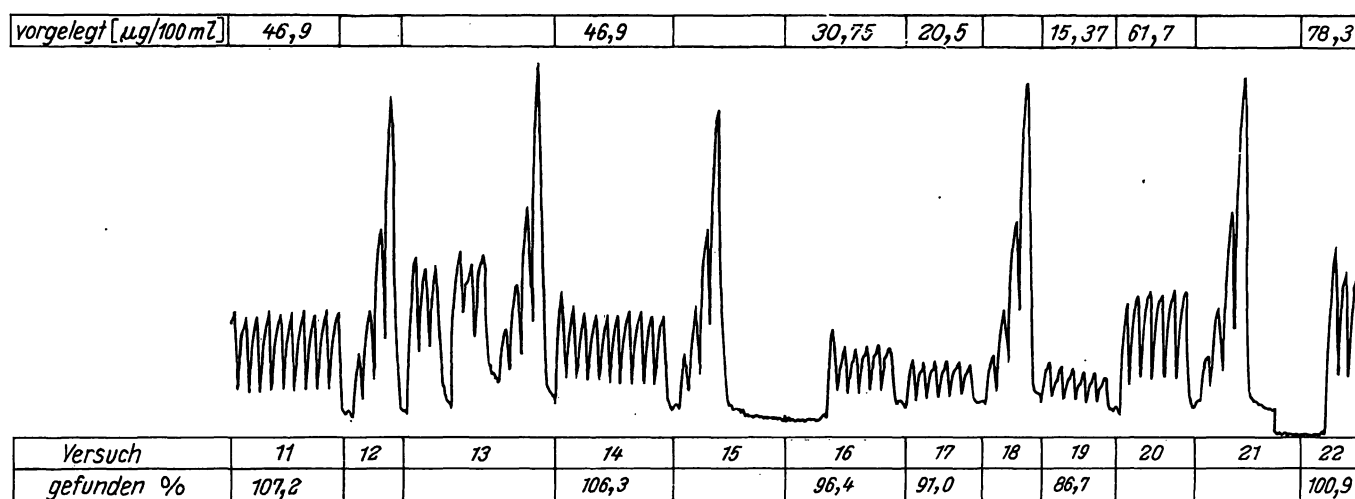
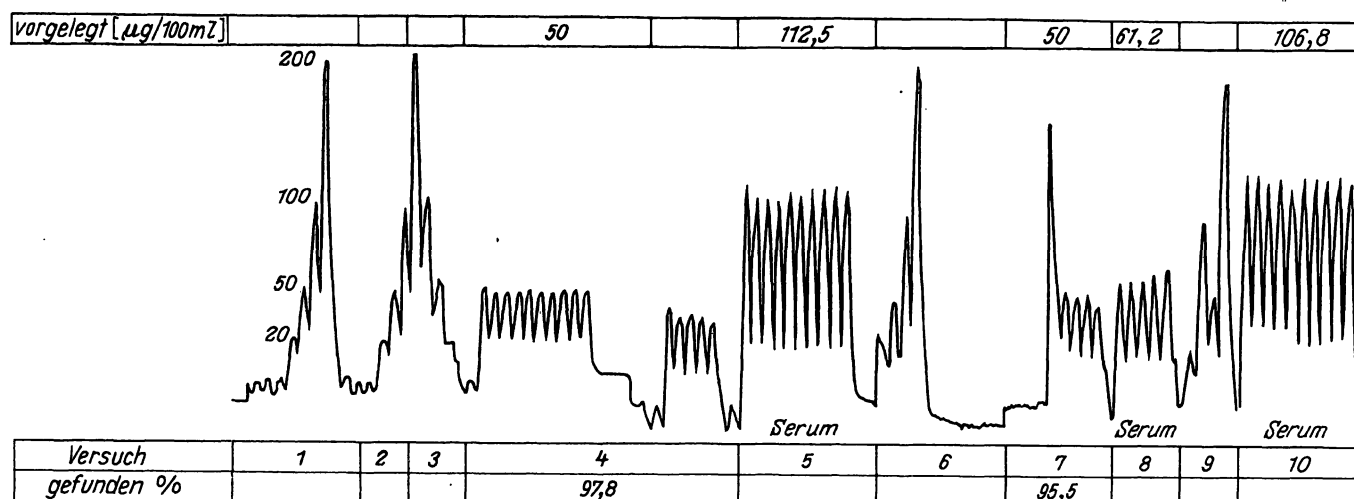


Abb. 2

Etwa 140 Eisenbestimmungen in Eisen-Eichlösungen, Seren, Serenadditionsgemischen im Technicon-Autoanalyzer (vgl. Text)

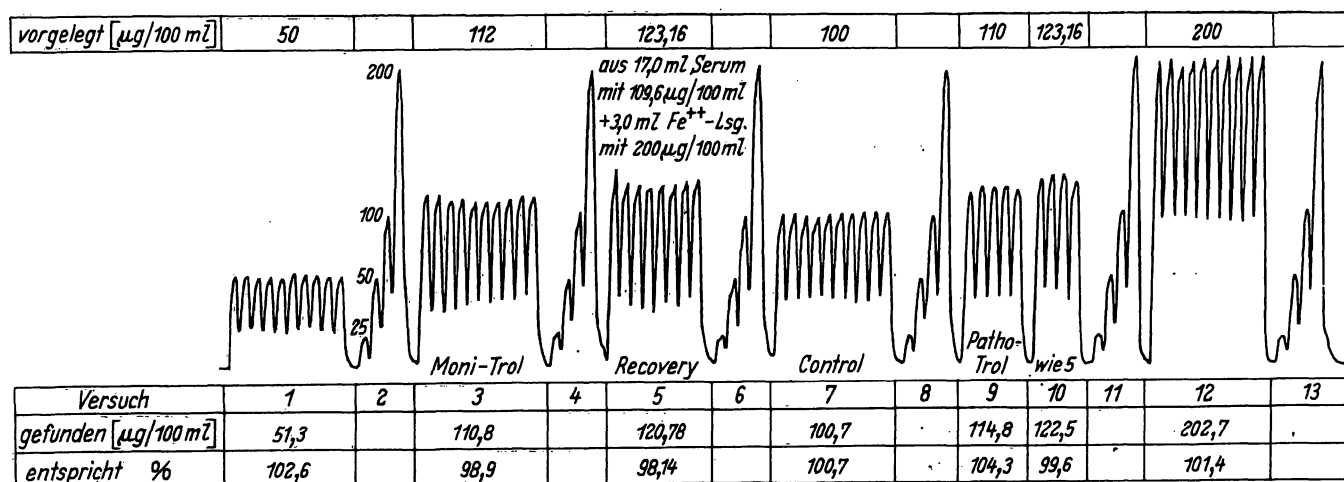


Abb. 3

Etwa 81 Eisenbestimmungen in Eichlösungen, Seren, Serenadditionsgemischen und Kontrollseren (vgl. Text)

Tab. 1
Beschreibung des Versuches vom 25. 4. 1966 (s. a. Abb. 2)

Versuch Nr.	vorgelegt	Fe in Eichkurven gefunden in $\mu\text{g} = \% (\mu\text{g}/\%)$				Fe in Serum-Recoveryversuchen vorgelegt $\mu\text{g} = \%$ gefunden $\mu\text{g} = \%$	
1	Eichkurve 1 aufst. 20/50/100/200	18/90	49/98	100/100	194/97	—	—
2	Eichkurve 2 aufst. 20/50/100/200	16/80	46/92	100/100	198/99	—	—
3	Eichkurve 2 abst. 20/50/100	14/70	50/100	106/106	—	—	—
4	Recovery 15 \times 50 μg Fe/100 ml aus Eichkurve	—	—	—	—	50/100	48,9/97,8
5	10 \times Serengemisch vom 25. 4. Serum II	—	—	—	—	—	112,5
6	Eichkurve 3 aufst. 20/50/100/200	20/100	42/84	94/94	192/96	—	—
7	Recovery 4 \times 50 μg Fe/100 ml aus Eichkurve	—	—	—	—	50/100	47,75/95,5
8	5 \times Serengemisch vom 4. 4. Serum I	—	—	—	—	—	61,2
9	Eichkurve 4 aufst. 20/50/100/200	14/70	46/92	94/94	182/91	—	—
10	10 \times Serengemisch vom 25. 4. Serum II	—	—	—	—	—	106,8
11	10 \times Recovery I	—	—	—	—	—	—
	12 ml Serum II + 16 ml H ₂ O	—	—	—	—	46,9/100	50,3/107,2
12	Eichkurve 5 aufst. 20/50/100/200	20/100	48/96	98/98	188/94	—	—
13	Eichkurve 6 aufst. 20/50/100/200	—	Zur Herstellung der Eichkurve benutzt				—
14	10 \times Recovery I	—	—	—	—	46,9/100	49,9/106,3
	12 ml Serum II + 16 ml H ₂ O	—	—	—	—	—	—
15	Eichkurve 7 aufst.	20/100	50/100	100/100	176/88	—	—
16	6 \times Recovery II	—	—	—	—	30,75/100	29,66/96,42
	5 ml Serum I + 5 ml H ₂ O	—	—	—	—	—	—
17	6 \times Recovery III	—	—	—	—	20,5/100	18,66/91,02
	5 ml Serum I + 10 ml H ₂ O	—	—	—	—	—	—
18	Eichkurve 8 aufst. 20/50/100/200	20/100	50/100	103/103	194/97	—	—
19	6 \times Recovery IV	—	—	—	—	15,37/100	13,33/86,74
	5 ml Serum I + 15 ml H ₂ O	—	—	—	—	—	61,7
20	6 \times Serum I vom 4. 4.	—	—	—	—	—	—
21	Eichkurve 9 aufst. 20/50/100/200	20/100	50/100	110/110	200/100	78,28/100	79,0/100,9
22	4 \times Recovery V	—	—	—	—	—	—
	5 ml Serum II + 2 ml H ₂ O	—	—	—	—	164,0/100	172,5/105,1
23	4 \times Recovery VI	—	—	—	—	194,22/100	207,9/107,1
	5 ml Serum II + 2 ml 300 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—
24	5 \times Recovery VII	—	—	—	—	—	—
	5 ml Serum II + 4 ml 300 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—
25	Eichkurve 10 aufst. 20/50/100/200	16/80	44/88	98/98	196/98	—	—
26	5 \times Recovery VIII	—	—	—	—	213,45/100	217,5/101,9
	5 ml Serum II + 6 ml 300 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—
27	5 \times Recovery IX	—	—	—	—	79,8/100	70,0/87,71
	5 ml Serum II + 5 ml 50 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—
28	Eichkurve 11 aufst. 20/50/100/200	14/70	48/96	100/100	196/98	—	—
29	5 \times Recovery X	—	—	—	—	104,8/100	102,8/98,28
	5 ml Serum II + 5 ml 100 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—
30	2 \times Recovery XI	—	—	—	—	154,8/100	151,5/97,86
	5 ml Serum II + 5 ml 200 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	—	—

Tab. 2

Richtigkeit der Eichkurven: 4 Eisen(II)-Stammlösungen mit 20, 50, 100 und 200 μg Fe/ml wurden in auf- bzw. absteigender Konzentrationsfolge („aufst.“ und „abst.“) (25. 4. 66) bestimmt. Zwischen jeder der 11 Eichkurven ($n = 11$) lagen etwa 10 Einzelbestimmungen in Seren; mit Versuch Nr. 6 wurde die Reproduzierbarkeit berechnet (vgl. Abb. 2 u. Tab. 1)

Versuche lfd. Nr.	Eichkurven Nr.	20 μg	%	Wiedergefunden in μg und % der Theorie				200 μg	%
				50 μg	%	100 μg	%		
1	1 aufst.	18	90	49	98	100	100	194	97
2	2 aufst.	16	80	46	92	100	100	198	99
3	2 abst.	14	70	50	100	106	106	—	—
6	3 aufst.	20	100	42	84	94	94	192	96
9	4 aufst.	14	70	46	92	94	94	182	91
12	5 aufst.	20	100	48	96	98	98	188	94
13	6 aufst.	20	100	50	100	100	100	200	100
15	7 aufst.	20	100	50	100	100	100	176	88
18	8 aufst.	20	100	50	100	103	103	194	97
21	9 aufst.	20	100	50	100	110	110	200	100
25	10 aufst.	16	80	44	88	98	98	196	98
28	11 aufst.	14	70	48	96	100	100	196	98
	\bar{x}	17,5	87,3	47,6	95,1	100,3	100,3	191,6	95,8
	s	2,7	15,45	2,73	5,75	4,73	4,72	7,53	3,93
	2s	5,39	—	5,47	—	9,47	—	15,06	—

Tab. 3
Beschreibung des Versuches vom 6. 7. 1966 (s. a. Abb. 3)

Versuch Nr.	vorgelegt	Fe in Eichkurven gefunden in $\mu\text{g} = \% (\mu\text{g}/\%)$				Fe in Serum-Recoveryversuchen vorgelegt $\mu\text{g} = \%$ gefunden $\mu\text{g} = \%$	
1	Recovery 10 \times 50 μg Fe/100 ml aus Eichkurve	—	—	—	—	50/100	51,3/102,6
2	Eichkurve 1 aufst. 20/50/100/200	20/100	50/100	102/102	200/100	—	—
3	Recovery Moni-Trol 112 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	112/100	110,8/98,9
4	Eichkurve 2 aufst. 20/50/100/200	22/110	50/100	104/104	195/97,5	—	—
5	Recovery 17 ml Serum II + 3 ml 200 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	123,16/100	120,9/98,14
6	Eichkurve E ₃ aufst. 20/50/100/200	20	50	100	200	100/100	100,7/100,7
7	Recovery Control-Serum	—	—	—	—	110/100	114,8/104,3
8	Eichkurve 3 aufst. 20/50/100/200	18/90	50/100	100/100	198/99	—	—
9	Recovery Pa'ho-Trol 110 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	123,16/100	122,5/99,6
10	Recovery wie 5	—	—	—	—	—	—
	17 ml Serum II + 3 ml 200 μg Fe/100 ml	—	—	—	—	200/100	202,7/101,4
11	Eichkurve 4 aufst. 20/50/100/200	20/100	50/100	104/104	206/103	—	—
12	Recovery 10 \times 200 μg Fe/100 ml aus Eichkurve	—	—	—	—	—	—
13	Eichkurve 5 aufst. 20/50/100/200	18/90	50/100	103/103	200/100	—	—

Tab. 4

Richtigkeit der Fe-Bestimmung nach 6 Eichkurven ($n = 5$) vom 6. 7. 66 aus Fe-Standardlösungen. Zwischen den einzelnen Eichkurven lagen etwa 10 Einzelbestimmungen im Serum (vgl. Abb. 3 u. Tab. 3)

Versuche lfd. Nr.	Eichkurven Nr.	Wiedergefunden in μg und % der Theorie							
		20 μg	%	50 μg	%	100 μg	%	200 μg	%
2	1 aufst.	20	100	50	100	102	102	200	100
4	2 aufst.	22	110	50	100	104	104	197	98,5
6	Ureickurve aufsteigend	20	100	50	100	100	100	200	100
8	3 aufst.	18	90	50	100	100	100	198	99
11	4 aufst.	20	100	50	100	104	104	206	103
13	5 aufst.	18	90	50	100	103	103	200	100
	\bar{x}	19,6	98	50	100	102,6	102,6	200,2	100,1
	s	1,67				1,67		3,49	
	2s	3,35	8,54	0	0	3,36	1,63	6,98	1,74

Berechnung: $47 \times 2,5 = 117,5 \mu\text{g/ml}$ gefunden; $(117,5 \times 20 + 10 \times 300) : 50 = 107,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ berechnet. Das zugesetzte Eisen wurde somit zu 108,4% wiedergefunden.

Serum-Eisen-Bestimmung ohne Dialyse

Durch die verschiedenen Eigenfärbungen der Seren (ikterische, lipämische usw.) müssen die Werte bei einer Arbeitsweise ohne Dialyse (5) verfälscht werden. Zu prüfen war, ob durch größere Verdünnung die Färbung so weit ausgeschaltet werden kann, daß die Methode den klinischen Anforderungen genügen würde. Dazu wurde die gleiche Versuchsanordnung verwendet wie bei den vorherigen Bestimmungen; lediglich die Dialyse wurde zur besseren Farbentwicklung durch eine Verzögerungsspirale ersetzt. Abspaltung und Reduktion wurden im ersten Schritt vorgenommen, danach tritt die Farbstoffkomponente hinzu. Die durch Vergleiche geprüften Versuchsergebnisse zeigten, daß ohne Dialyse, d. h. ohne Enteiweißung, die Richtigkeit und Spezifität nicht erreicht werden kann wie mit Dialyse.

Fehlermöglichkeiten

Wenn das Serum in die Probenbecher des Autoanalyzers gegeben ist, kommt es nicht mehr mit Fremdkörpern (Pipetten, Meßzylinder usw.) in Berührung; die größte Fehlerquelle ist damit ausgeschlossen, nämlich die wechselnde Genauigkeit und Sauberkeit der Ausführenden. Die Möglichkeiten zur Einschleppung von Fremdeisen sind auf ein Minimum reduziert. Fehler bei der Herstellung der Reagenzlösung entfallen praktisch, da es sich um eine Relativmessung handelt und Reagenzfärbungen physikalisch in die Basislinie verlegt werden. Die Genauigkeit bei der Herstellung der Eichlösungen wird durch Lab-Trol, Patho-Trol usw. kontrolliert. Somit bleiben bei sachgemäßer Abnahme der Proben die Fehlerquellen gering.

Unser besonderer Dank gilt den Herren Dr. W. APPEL (Biochem. Abt., Knoll A. G., Ludwigshafen), R. BALKENHOL, Oberarzt Dr. R. JACOBS und cand. med. R. KÖHLER für Hilfe in der Statistik und Technik und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung einiger Geräte.

Literatur

- HEILMEYER, L. und K. PLÖTNER, Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Gustav Fischer Verlag, Jena (1937).
- KEIDERLING, W. und H. P. WETZEL, Angew. Chem. 78, 664 (1966).
- DELCOURT, R., Eine automatische Methode zur Serumeisen-Bestimmung. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 513—518 (1964).
- FÜHR, J., Automatische Serumeisen-Bestimmung ohne Dialyse. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 465—469 (1964).
- HENRIKSEN, A., Die automatische Bestimmung von Mangan und der Permanganat-Zahl in Süßwasser, und die Bestimmung von Eisen in Meer- und Süßwasser. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 53—59 (1965).
- LANDERS, J. W. und B. ZAK, Amer. J. Clin. Path. 29, 590 (1958).
- LEPPLA, W., W. BROKATE und H. E. KELLER, Eine Methode zur automatischen Bestimmung des Serumeisens. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 225—229 (1963).
- SUMMERS, R. M., H. B. MEFFERT jr. und H. R. LITTLETON, Automatische Mikro-Analysen mit Überdruckdialyse, angewandt auf die Bestimmung von Kupfer, Magnesium und Eisen im Serum. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 459—463 (1964).
- STEINER, TH. P., Iron in Sodium Products. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 930 (1965).
- ZAK, B. und E. EPSTEIN, Automatische Bestimmung von Serumeisen. Internat. Technicon Sympos. Automation in der Analyt. Chemie, S. 485—492 (1964).
- DEGGAU, E., F. KRÖHNKE, K. E. SCHNALKE, HJ. STAUDINGER und W. WEIS, diese Z. 3, 102 (1965).
- STAMM, D., HJ. STAUDINGER und W. WEIS, diese Z. 4, 222 (1966).
- LAUBER, K., diese Z. 3, 96 (1965).
- DOERFFEL, K., Z. analyt. Chem. 185, 1 (1962).
- E. MERCK, AG., „Mercko-Test“-Vorschrift, Darmstadt (1966).
- RICHTERICH, R., Klinische Chemie, Theorie und Praxis. Akadem. Verlags-Ges., Frankfurt/M. (1965).
- CIBA AG., Eisenbestimmung im Urin; Arbeits-Anweisung, Wehr/Baden (1966).

Professor Dr. HJ. Staudinger
63 Gießen, Friedrichstr. 24

Prof. V. Klingmüller
6800 Mannheim
Städt. Krankenanstalten